

高酸素負荷新生仔ラットの脳障害モデルとしての有用性の検討

昭和大学医学部薬理学講座（医科薬理学部門）

佐藤千佳 辻まゆみ 小口勝司

昭和大学医学部生理学講座（生体防御学部門）

中西孝子

昭和大学医学部解剖学講座（顕微解剖学部門）

舟橋久幸 塩田清二

昭和大学医学部眼科学講座

齋藤雄太 植田俊彦 小出良平

連絡先：昭和大学医学部薬理学講座医科薬理学部門

e-mail address: kurachika@med.showa-u.ac.jp

Tel: 03-3784-8125

Fax: 03-3787-4790

ランニングタイトル：高酸素負荷新生仔ラットの脳内酸化ストレス

キーワード：高濃度酸素負荷，酸化ストレス，海馬，脳障害モデル， Nox4

要約：生直後から 12 日齢まで 80%酸素にて飼育した未熟児網膜症モデルラットと以前、報告された高酸素負荷による酸化ストレス誘発性脳障害モデルと比較し、未熟児網膜症モデルの酸化ストレス誘発性脳障害モデルとしての有効性について検討した。出生直後より 12 日齢まで 80%高酸素負荷ラット (P12) およびその後大気中に移動し 24 時間飼育したラット (P13) は、脳(海馬)を摘出した。海馬の凍結切片を作成し、DNA 酸化損傷マーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を免疫染色し、局在を確認した。また、ホモジェネートを作成し、酸化ストレスマーカーである reactive oxygen species (ROS)、脂質過酸化物質 (malondialdehyde:MDA)、酸化型グルタチオン (GSSG) 量を、RT-PCR 法により O_2^- を酸素と過酸化水素へ不均化する酸化還元酵素 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) mRNA を測定し、記憶や学習に関わる海馬への酸化ストレスを確認した。さらに、ROS を積極的に産生する酵素 type 4 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (Nox4) mRNA を測定し、Nox4 の役割について考察した。8-OHdG はコントロール群に比べて、高酸素負荷終了直後 (P12) 増加していた。特に、CA1, CA3, 歯状回 (DG) では 8-OHdG 陽性細胞数の増加は顕著だった。P12 海馬内 ROS, Cu/Zn SOD mRNA, GSSG, MDA 量は高酸素負荷群でコントロール群に比べ有意に増加しており、P13 でも同様の結果を示した。P12 での海馬内酸化ストレスの結果はこれまでの報告と一致していた。海馬 Nox4 mRNA はコントロールに比べ P13 の酸素負荷群で 2.7 倍となり、相対的低酸素状態 (脳虚血) から低酸素状態への適応 (再灌流) による神経変性を増悪する可能性が示唆された。ラット脳、網膜などの神経組織が成熟する生後 12 日 (P12) まで高酸素投与を継続する未熟児網膜症モデルは本研究により初めて酸化ストレス誘発性脳障害モデルとしても応用可能であることが示された。

過去 20 年の間に未熟児の生存率は極めて増加したが、長期成長過程で能力障害を持つ乳幼児の数も増加している^{1,2,3)}。近年、新生児集中治療室で用いられる酸素について多くの研究結果が報告されているが、未熟児の吸入気酸素濃度も未だ決まらないなど多くの問題が残されている⁴⁾。生体内では活性酸素種 (ROS: $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 , O_2^- など) を酵素反応やエネルギー産生などに利用すると同時にこれら ROS に対する抗酸化防御機構を備えている。新生児呼吸困難の治療のための酸素投与は ROS 生成と抗酸化物のバランスをくずし酸化ストレスとなり、アポトーシスや細胞障害を引き起こす⁵⁾。特に早産による脳内抗酸化防御機構が未熟なままのげっ歯類やヒト脳は有害な環境刺激や侵襲の影響を受けやすく⁶⁾、高酸素負荷により灰白質や白質に障害がおこり、行動に制限や障害が現れると考えられている^{7,8,9)}。たとえば Gerstner B. らは 3, 6 日齢仔ラットを 80% 酸素 24 時間負荷により⁷⁾、Schmitz T らは 6 日齢から 48 時間 80% 酸素負荷により⁸⁾、脳内ミエリン形成不全が起こることを報告している。高酸素負荷による酸化ストレス誘発性脳障害モデルの確立のため負荷酸素濃度や暴露時間の調整が行われている。

また、近年 ROS を積極的に生成する酵素系として知られている NADPH オキシダーゼ (NADPH oxidase: Nox) について注目した。Nox による ROS の生成により生体内で活性酸素を有効に活用するための条件「時間」「空間」「量」の均衡が保たれる。臓器別に、いくつかのホモログがあり、Nox ファミリーを形成している¹⁰⁾。Nox4 はヒト腎皮質に高発現する Nox として同定され、腎臓において酸素センサーや細胞の増殖の制御に関わっている可能性が示唆されている¹¹⁾。虚血再灌流後のマウスの脳の梗塞部位および急性脳卒中患者における脳梗塞部位では、Nox1 や Nox2 ではなく、Nox4 発現が誘発された。Nox4 による酸化ストレスが、神経細胞アポトーシスや血液脳関門漏出を介して神経損傷を引き起こすが、Nox4

欠損マウスではそれらの障害改善が報告され¹²⁾，脳内酸化ストレスによる神経細胞アポトーシスや神経障害に Nox4 が関与していることが強く示唆された．未熟児網膜症 (oxygen-induced retinopathy :OIR) モデルラットは，生直後から 12 日齢まで 80%酸素にて飼育し，13 日-18 日齢まで大気中で飼育することにより作成できる．

今回は，OIR モデルにおける生後より 12 日間の 80%高酸素負荷時 (P12) ならびに 80%から 20%に酸素濃度を低下した状態 (P13) での脳内酸化ストレス変化に着目し，OIR モデルの脳障害モデルとしての有効性について検討した．

研究方法

1. 高酸素負荷モデル作成

高酸素負荷ラットは新生仔 Sprague-Dawley ラットを，生直後から日齢 12 (Postnatal day 12: P12) まで毎日 80%酸素下 20.5 時間，大気下 0.5 時間，次いで 3 時間かけて 80%酸素負荷に戻す周期で飼育し，その後大気中で 24 時間飼育し (P13)，作製した¹³⁾．酸素負荷には OxyCycler model A84X0V (Reming Bioinstruments compay, NY, USA) を用いた．生後 12 日 (P12)，または 13 日 (P13) で新生仔ラットに 6.5mg/10g body weight ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル，共立製薬株式会社，東京) を i.p. 投与し，屠殺した (Fig. 1)．直ちに氷上で脳を取り出しし，海馬を摘出し実験に用いた．本実験は昭和大学動物実験規定に基づき計画し，承認を得て実施した．

2. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 染色

摘出した海馬を，30%スクロースを含む phosphate buffered saline (PBS) で 48 時間固定した．その後、冷却した 2-メチルブタン上で，スクロース固定脳を O.C.T. Compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek USA, Inc., CA, USA) で包埋し液体窒素で凍結し，-80℃で保存し実験に用いた．クライオスタットを用いて 40 μ m のラット脳冠状切片を作製し，4%のパラホルムアルデヒドで固定し，anti 8-OHdG (Nikken SEIL Co. LTD., Tokyo, Japan) で標識後，二次抗体には Alexa 568 conjugated goat anti-mouse (Invitrogen., CA, USA) を使用した．標本のイメージは共焦点レーザー顕微鏡システム (A1, Nikon Co. Tokyo, Japan) により撮影した．

3. 酸化ストレスマーカー測定

氷上で摘出したラット脳から海馬を採取し、直ちに液体窒素を用いて凍結した。ROS, malondialdehyde (MDA) 量は Proteinase Inhibitor Cocktail (共立製薬株式会社、東京) : PBS (2000:1) で 10% ホモジネートを作製し測定した。ROS の測定には general oxidative stress indicator 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein (CM-H₂DCFDA, Molecular Probes Inc., CA, USA) を用いた¹⁴⁾。CM-H₂DCFDA は細胞内に取り込まれた後エステラーゼによって 2',7'-ジクロロフルオレッシンに変化し、細胞内 ROS により酸化されて蛍光性の 2',7'-ジクロロフルオレッセインを生じる。100 μ M の CM-H₂DCFDA 50 μ L を PBS 1 mL に溶解した。海馬 10% ホモジネート 20 μ L に、100 μ M の CM-H₂DCFDA 溶液を 50 μ L 添加し、37°C で 15 分間 インキュベート後、励起波長 488 nm, 測定波長 525 nm で蛍光強度を蛍光プレートリーダー (Berthold Technologies GmbH & Co., KG, Bad Wildbad, Germany) で測定した。

MDA 量は MDA-586 Assay Kit (Bioxytech International, Inc., CA, USA) を用いて測定した。

GSSG (酸化型 Glutathione) 量は GSSG/GSH Quantification Kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc. Kumamoto, Japan) を使用し測定した。海馬の凍結組織 100 mg を 5% 5-スルホサリチル酸 (SSA) (和光純薬工業株式会社、東京) 水溶液 500 μ L でホモジネート後、8,000 \times g で 10 分間遠心し、得られた上清を純水にて SSA 濃度が 0.5% になるよう希釈したものを測定試料とした。タンパク量は Bio-Rad Protein Assay 試薬 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いて測定した。

4. Cu/Zn SOD および Nox4 mRNA 測定

海馬ホモジネート (1 mg / 10 μ L RNAlater RNA stabilization reagent, QIAGEN, Hilden Germany) から分離した全 RNA を, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて逆転写反応 (37°C 60 分間, 93°C 5 分間加熱) を行い, 得られた cDNA を PCR のテンプレートとした.

Cu/Zn SOD , NOX4 RT-PCR 用のオリゴヌクレオチドプライマーはデザインして, Sigma Aldorich (Tokyo, Japan) より入手した. Cu/Zn SOD に使用したプライマーは, 5' -GCGTCATTCACTTCGAGCAG -3' (forward), 5' -ATAGGGAATGTTTATTGGGCAATC-3' (reverse). β アクチン (

5' -TTGTAACCAACTGGGACGATATGG -3' (forward), 5' -GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3' (reverse)) の発現を内部標準として測定した. RT-PCR は, Omniscript RT キット (QIAGEN (株)) を使用し, Cu/Zn SOD の増幅反応は, 94°C 30 秒間, 56°C 30 秒間, 72°C 60 秒間, サイクル数は 30 サイクルで実施した. また, β アクチンは, 25 サイクルで増幅した. PCR 生成物は, 2 %アガロースゲルにて泳動し ultraviolet transilluminater にて各バンドを可視化した. バンドの輝度は Scion Image Version 4.02 software にて測定し. Cu/Zn SOD の輝度と β -actin の輝度 の比を算出し、コントロール群に対する % で表示した.

Nox4 に用いたプライマーは, 5' -CTTACCTTCGCGGATCACAG-3' (forward), 5' -TTGCTTTTGTCCAACAATCTTC -3' (reverse) . 18s mRNA の発現を内部標準として測定した¹⁵⁾. Light Cycler TaqMan Master mix (Roche Diagnostics K. K., Tokyo, Japan) を使用し, LightCycler でリアルタイム PCR を行い測定した. PCR 反応は, 95°C 10 分間, 95°C 10 秒間, 61°C 20 秒間, 72°C 1 分間, 増幅

サイクル数は 35 サイクルで実施した。蛍光値は LightCycler software (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) で分析した。

結果

DNA 酸化損傷マーカーである 8-OHdG はコントロール群に比べて、高酸素負荷終了直後 (P12) 増加していた。特に、CA1, CA3, 歯状回 (DG) における 8-OHdG 陽性細胞数の増加は顕著だった。高酸素負荷終了 24 時間後 (P13) でも P12 と同様の結果を示した (Fig. 2)。

酸化ストレスマーカー測定結果を Table 1 に示した。海馬内 ROS の値は、高酸素負荷群 で P12: 87.06 ± 6.95 , P13: 77.92 ± 4.63 Fluorescence Intensity (FI)/mg protein とコントロール群 (P12: 65.74 ± 5.02 , P13: 63.58 ± 2.45 FI/mg protein) と比較して有意に高かった (n=8, *: $P < 0.05$ vs control)。高酸素負荷群 P13 の ROS は P12 に比べ低い値であった。

Cu/Zn SOD mRNA 量は、P12, P13 において高酸素負荷群では、それぞれ $154 \pm 18\%$, $153 \pm 11\%$ であり、両日令においてコントロール群に比べ有意に高かった (n=5, *: $P < 0.05$ vs control)。コントロール群の P12 の Cu/Zn SOD mRNA / β actin mRNA は、 1.52 ± 0.18 を示し、P13 では 1.39 ± 0.10 を示した。

GSSG 量は高酸素負荷群で P12 (0.41 ± 0.10 pmol/ μ g protein), P13 (0.42 ± 0.10 μ mol/mg protein) 共にコントロール群に比べ有意に増加した。(n=8, *: $P < 0.05$ vs control)。

高酸素負荷群の MDA 量は P12: 0.35 ± 0.05 mmol/mg protein, P13: 0.34 ± 0.02 mmol/mg protein 共にコントロール群に比べ増加しており、P13 では有意に増加した (n=5, *: $P < 0.05$ vs control)。

海馬内 Nox4 mRNA 量は、P12 においてコントロール群、高酸素負荷群に差はなかったが、P13 においてコントロール群を 100% ($100 \pm 61\%$) としたとき、高酸素負荷群では $270 \pm 38\%$ となり、有意に増加した (n=4, *: $P < 0.05$ vs control, Fig. 3)。コントロール群の P12 の Nox4 mRNA は、 0.21 ± 0.06 を示し、P13 は

0.24 ± 0.04 を示した.

考察

今回使用した生直後から 12 日齢 (P12) までの高酸素負荷モデルは、生直後から 5 日齢まで 80%酸素負荷を施行した Kurul S. ら^{16, 17)}と同じく海馬において酸化ストレスを惹起し、記憶や学習に関与する海馬歯状回、CA1, CA3 領域の DNA 損傷が増加することが明らかとなった。

ラット P1 大脳半球より初代培養した oligodendrocyte を用いた実験では 80%酸素にて 6 時間培養後ミトコンドリアに superoxide (O_2^-)、可用性分画に ROS が増加し、細胞死は増加した。この細胞死はカタラーゼや SOD を添加することにより抑制された⁷⁾。我々の用いたモデルでは生直後から 80%酸素という環境により脳内 ROS は増加し、これに対応すべく細胞内 Cu/Zn SOD mRNA が増加したものと考えられる。しかし、高酸素負荷により GSSG 量はコントロールに比べ高かったことから脳内酸化還元平衡は酸化側へ傾いていたと推測される。これは生後 6 日 (P6) ラットを 12 時間 80%酸素暴露することにより脳内抗酸化物質チオレドキシンが減少したという Bendix I. らの報告¹⁸⁾と一致している。今回、脂質過酸化物質として MDA 量を測定した。正常な組織においても MDA は代謝物として存在するが、高酸素負荷直後から酸化ストレスに対応し、神経細胞に多く含まれる多価不飽和脂肪酸（リン脂質）の過酸化反応やアポトーシスにより MDA 量が増加したと推測される。Solberg R らは新生仔豚を生直後に仮死状態から蘇生 (21, 40, 100%酸素負荷)、9 時間後に 100%酸素 30 分投与し、前頭前部皮質の脂質過酸化物質 (neuroprostanes, neurofurans) の変化を観察した¹⁹⁾。超低体重出生児白質脳症の患者脳脊髄液中脂質過酸化物質 (8-isoprostane) は白質脳症ではない超低体重児患者に比べ有意に高値であり⁹⁾、血清 MDA の増加が空間学習や記憶、宣言認知に関わるという報告もあり^{20, 21)}興味深い。100%酸素投与により過

酸化脂質が増加することから蘇生後の障害と酸素療法危険性を示唆した。6日齢のラットを80%酸素に暴露すると、暴露12時間後にはcaspase-3, caspase-2活性が数倍に増加したと報告しており²²⁾、これに続き細胞死は増加する²³⁾。我々はDNA酸化ストレスマーカーである8-OHdG染色により海馬歯状回、CA1、CA3に陽性細胞が局在することを明らかにした。これは高酸素負荷によりラット海馬CA1と歯状回領域における顆粒球細胞のアポトーシスや神経脱落が生じること^{16, 17)}、マウス海馬CA1、CA3では細胞層の厚みが薄くなり、歯状回の厚みは大きくなるという形態変化が報告と一致した²⁴⁾。

今回用いた高酸素負荷モデルは、P12で80%酸素供給から突然大気中(20%酸素)で飼育されるという状況は相対的低酸素状態となり、網膜において「虚血」に近い状況が生じると考えられる^{25, 26)}。本実験において、酸素負荷終了24時間後(P13)には海馬Nox4 mRNAが急激に増加することが示された。Nox4はスーパーオキシド(O_2^-)を生成する酵素であり、Nox4増加は酸化ストレスを誘導する。P13では、ラットは、高酸素状態から大気へ移動する。これより、脳内では速やかにROSやGSSGが減少すると考えていたが、P13におけるこれらの値はP12と同等であった。高酸素状態から大気への移動は、酸素濃度の急激な低下が生じたことになり、これらの酸化ストレスマーカーが高値を示したと考えられる。長期間の高酸素状態から大気(20%酸素)への移動は、酸素濃度の急激な低下であり、相対的に低酸素状態となり「脳虚血」と同等の変化が生じたと考えられる。その後は、徐々に低酸素状態に適応し、組織や細胞内では「再灌流」と同様に酸素が供給され、20%酸素に適応したと考えられる。また、脳内酸塩基平衡が酸性側に傾いたままである理由に相対的低酸素状態(脳虚血)から低酸素状態への適応(再灌流)によりミトコンドリア障害が生じ、スーパーオキシド(O_2^-)を生成する酵素であるNox4が増加した可能性がある²⁰⁾。本実験結果

では高酸素負荷群の Nox4 の発現は P13 でコントロール群の 2.7 倍に増加した。NADPH オキシダーゼ抑制薬を急性脳卒中モデルラットに処置すると Nox4 の減少と細胞保護が示され、Nox4 がヒト脳虚血において酸化ストレスの主な発生源となりえるとの報告からも、虚血により増加した Nox4 により生じた酸化ストレスが、血液脳関門損傷や神経細胞毒性を誘発している可能性がある¹²⁾。また、Nox4 は大脳微小血管内皮細胞や血管内皮細胞²⁷⁾において酸化ストレスによる TNF- α 産生を抑制し、アテローム硬化性病変を抑制する可能性が示唆されているが、虚血—再灌流による CA1 の神経変性を増悪することも報告されている²³⁾。

ラットやマウスでは出生後脳内神経線維の有髓化が完了するには 10 日程度を必要としている¹⁶⁾。生後 3 日 (P3) または P6 に 80%酸素 24 時間暴露したマウス脳では P11 に神経線維の有髓化はほとんど進まない^{8, 28)}。新生児脳もまた高酸素濃度に対し脆弱であり⁴⁾、呼吸困難の治療のための酸素は脳内で酸化ストレスを招き¹⁸⁾、神経細胞のアポトーシスを引き起こす^{7, 8, 20, 21)}。この障害は成長過程で能力障害として現れる可能性があり、障害を抑制するべく治療法や酸素投与法が動物モデルを用いて探求されている^{29, 30)}。

以上より、ラット脳、眼球などの神経組織が成熟する生後 12 日 (P12) まで高酸素投与を継続する今回の未熟児網膜症モデルラットにおいて、初めて酸化ストレスによる神経細胞アポトーシスが確認されたことより、脳障害モデルとしても応用可能であることが示された。

文献

- 1) Moore T, Hennessy EM, Myles J, *et al.* Neurological and developmental outcome in extremely preterm children born in England in 1995 and 2006: The EPICure studies. *BMJ*. 2012; **345**: e7961.
- 2) Vasiljevic B, Maglajlic-Djukic S, Gojnic M, *et al.* The role of oxidative stress in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Srp Arch Celok Lek*. 2012; **140** : 35-41.
- 3) Johnson S, Wolke D, Hennessy E, *et al.* Educational outcomes in extremely preterm children: neuropsychological correlates and predictors of attainment. *Dev Neuropsychol*. 2011; **36** : 74-95.
- 4) Saugstad OD. Hyperoxia in the term newborn: more evidence is still needed for optimal oxygen therapy. *Acta Paediatrica*. 2012; **101**(Suppl.464): 34-38.
- 5) Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011; **194** : 7-15.
- 6) Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effect on preterm birth. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2010; **15** : 191-195.
- 7) Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, *et al.* Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *Neurobiol Disease*. 2008; **28** : 1236-1245.
- 8) Schmitz T, Ritter J, Mueller S, *et al.* Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. *J Neurosci*. 2011; **31**: 4327-4344.
- 9) Inder T, Mocatta T, Dariow B, *et al.* Elevated free radical products in the cerebrospinal fluid of VLBW infants with cerebral white matter injury. *Pediatr Res*. 2002; **52**: 213-218.
- 10) Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J*. 2008; **275** :3249-3277.
- 11) Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, *et al.* A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol chem* 2001; **276**:1417-1423.
- 12) Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol*. 2010 ; **8**(9). pii: e1000479.
- 13) Hasebe Y, Thomson LR, Dorey CK. Pentoxifylline inhibition of vasculogenesis in the neonatal rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; **41**: 2774-2778.
- 14) Afzal M, Matsugo S, Sasai M. Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 ;**304**:619-624.
- 15) Freidja ML, Toutain B, Caillon A. Heme oxygenase-1 is differentially involved in blood flow-dependent arterial remodeling: role of inflammation, oxidative stress, and nitric oxide. *Hypertension*. 2011; **58** :225-31.

- 16) Kurul SH, Yis U, Kumral A, *et al.* Protective effects of topiramate against hyperoxic brain injury in the developing brain. *Neuropediatrics*. 2009; **40** : 22-27.
- 17) Yiş U, Kurul SH, Kumral A. Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain. *Brain and Development*. 2008; **30** : 556-562.
- 18) Bendix I, Weichelt U, Strasser K, *et al.* Hyperoxia changes the balance of the thioredoxin/peroxiredoxin system in the neonatal rat brain. *Brain Res*. 2012; **1484**: 68-75.
- 19) Solberg R, Longini M, Proietti F, *et al.* Resuscitation with supplementary oxygen induces oxidative injury in the cerebral cortex. *Free Radic Biol Med*. 2012;**53**:1061-1067.
- 20) Taridi NM, Abd Rani N, Abd Latiff A. Tocotrienol-rich fraction reverses age-related deficits in spatial learning and memory in aged rats. *Lipids*. 2014 ; 49: 855-869.
- 21) Talarowska M, Gałeczki P, Maes M. Malondialdehyde plasma concentration correlates with declarative and working memory in patients with recurrent depressive disorder. *Mol Biol Rep*. 2012 ; **39**: 5359-5366.
- 22) Sideinfwe M, Bendix I, Borner C, *et al.* Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis. *Cell Death and Disease*. 2012; **3**: e250.
- 23) Federhoff-Mueser U, Siffringer M, Polley O, *et al.* Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain. *Ann Neurol*. 2005; **57** : 50-59.
- 24) Ramani M, van Groen T, Kadish I, *et al.* Neurodevelopmental impairment following neonatal hyperoxia in the mouse. *Neurobiol Dis*. 2013; **50** : 69-75.
- 25) Minami M, Hasebe Y, Nakanishi-Ueda T, *et al.* Inhibition of oxygen-induced retinal neovascularization in neonatal rat by green tea extract. *J Clin Biochem Nutr*. 2003; **33**: 23-31
- 26) Niatsetsckaya ZV, Sosunov SA, Matsiukevich D, *et al.* The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice. *Neurobiology of Disease*. 2012 ; **32**:3235-3244.
- 27) St Hilaire C, Koupenova M, Carroll SH, *et al.* TNF- α upregulates the A2B adenosine receptor gene: The role of NDA(P)H oxidase 4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; **375** : 292-296.
- 28) Gerstner B, Siffringer M, Dzietko M, *et al.* Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter. *Ann Neurol*. 2007; **61** : 562-573.
- 29) Siffringer M, Brait D, Weichelt U, *et al.* Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain. *Brain Behav Immun*.

2010; **24**: 792-799.

- 30) da Silva AI, Monteiro Galindo LC, Nascimento L, *et al.* Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. *Can J Physiol Pharmacol.* 2014 ; **92**:330-337.

Usefulness of neonatal rats exposed to hyperoxia as a model of brain damage

Chika SATO, Mayumi TSUJI and Katsuji OGUCHI

Department of Pharmacology, Showa University School of Medicine

Takako NAKANISHI-UEDA

Department of Physiology, Showa University School of Medicine

Hisayuki FUNAHASHI, Seiji SHIODA

Department of Anatomy, Showa University School of Medicine

Yuta SAITO, Toshihiko UEDA, Ryohei KOIDE

Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine

Abstract --- We evaluated whether the retinopathy of prematurity treatment model which maintained neonatal rats in 80% oxygen till postnatal day 12 (P12) is an utilizable as brain damage model. The rats were loaded in hyperoxia-normoxia cycle until P12 and then transfer under normoxic conditions (room air) for 24 hours (P13). The rats at P12 and P13 were sacrificed and the hippocampus was removed. The tissue cryosections were prepared and oxidative stress in hippocampus was assessed by immunohistochemical staining for 8-hydroxy-2'-deoxyfuanosine (8-OHdG: a DNA marker for oxidative stress). Furthermore, reactive oxygen species (ROS), lipid hydroperoxide (malondialdehyde: MDA), oxidized glutathione (GSSG) were determined. We also assayed Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) mRNA and type 4 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (Nox4) mRNA. The amount of 8-OHdG positive cells increased at CA1, CA3 and dentate gyrus in hyperoxic group. At P12 and P13 in hyperoxic group, ROS, Cu/Zn SOD mRNA, MDA, and GSSG levels significantly increased. At P13, Nox4 mRNA level increased 2.7 times higher than in control group. Nox4-mediated oxidative stress may lead to in neuronal injury. In this study, the oxidative stress makers increased in hyperoxic group at P12 which is necessary period for maturation of neuron and retina. These results corresponded with previous other reports of the oxidative stress-induced brain damage model. Therefore, this encephalopathy model was thought to be the available model for a study of health maintenance for the premature infant.

Key words: hyperoxia, oxidative stress, hippocampus, brain damage model, Nox4

Table 1. The levels of oxidative stress maker in hippocampus at P12 and P13.

	ROS (fluorescein intensity/ mg protein)		Cu/Zn SOD mRNA / β -actin mRNA(% of control)		GSSG (μ mol/ mg protein)		MDA (mmol/mg protein)	
	P12	P13	P12	P13	P12	P13	P12	P13
Control group	65.74 \pm 5.02	63.58 \pm 2.45	100 \pm 13	100 \pm 19	0.18 \pm 0.03	0.19 \pm 0.02	0.26 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01
Hyperoxic group	87.06 \pm 6.95	77.92 \pm 4.63	154 \pm 18	153 \pm 11	0.41 \pm 0.10	0.42 \pm 0.10	0.35 \pm 0.05	0.34 \pm 0.02
number	8	8	5	5	8	8	5	5
*P value	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	N.D.	<0.05

* Significant statistical difference: *p<0.05 vs control group. Each value represents the mean \pm s.e.m.

Fig.1

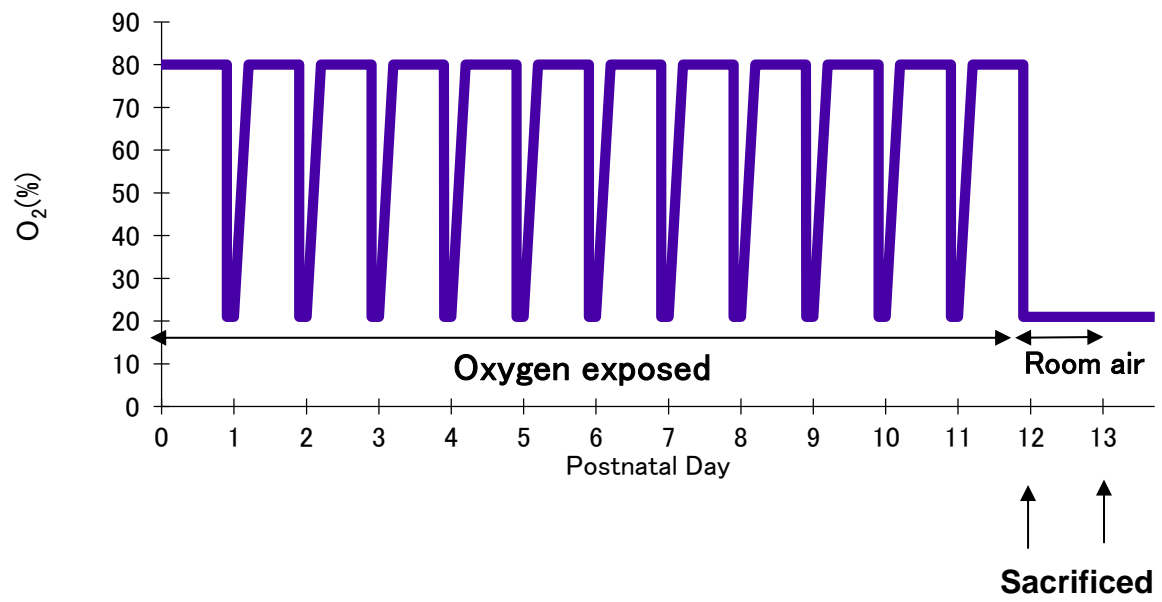


Fig. 2

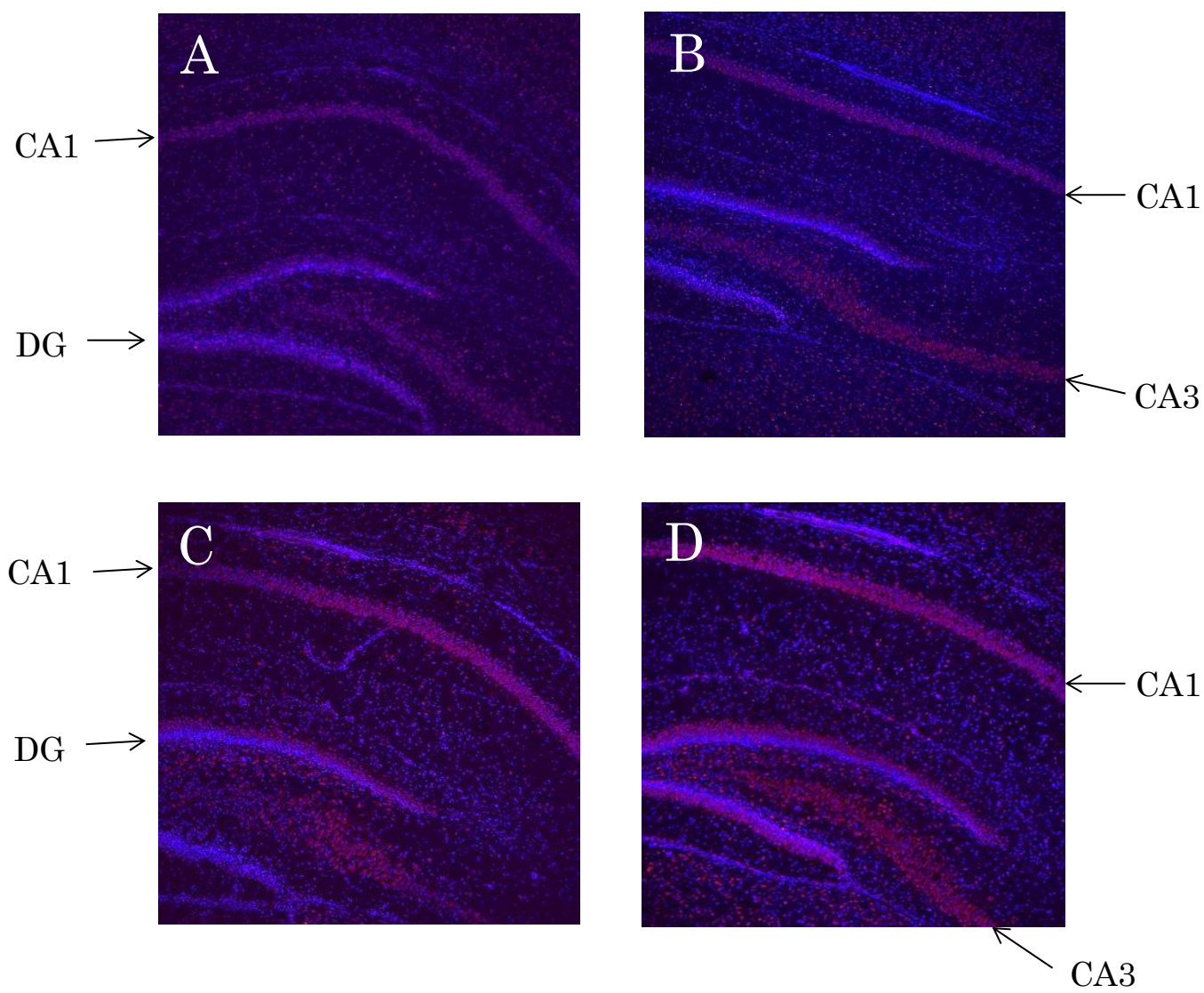


Fig. 3

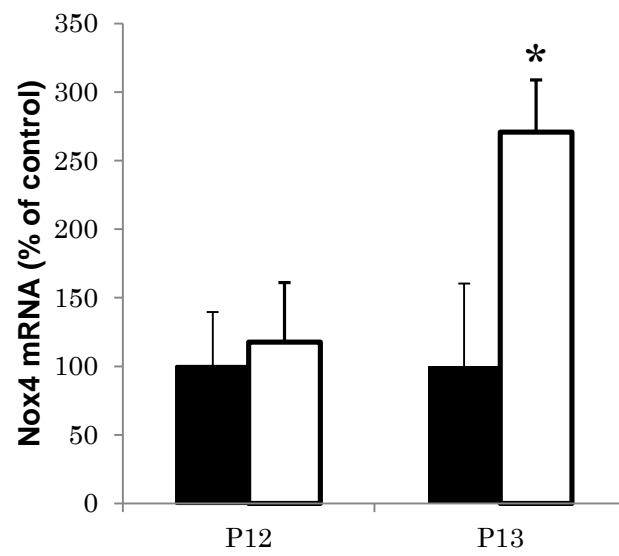


Figure legends

Fig.1. Animal model

Hyperoxia groups were exposed to daily cycles of 80% oxygen (20.5 hr), room air (0.5 hr), and progressive return to 80% oxygen (3 hr) from postnatal day 0 (P0) to P12, and then placed in ambient air until P13.

Fig.2. 8-OHdG immunohistochemical staining in hippocampus

Representative image for hippocampus at P12 (A), P13 (B) in control group, and P12 (C), P13 (D) in hyperoxia group. 8-OHdG staining show increased oxidative stress (bright red spots) at CA1, CA3 and dentate gyrus (DG) in hyperoxia group (C,D).

Fig.3. Effect of hyperoxia on Nox4 levels in hippocampus at P12 and P13.

Data are expressed as percentage of control (Nox4 mRNA/ β -actin mRNA), mean \pm SE, n=5, *:P<0.05. Closed column shows control group and open column shows hyperoxia group.